

#34



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer internationalen Patentanmeldung

Aktenzeichen: PCT/DE 96/02485

**Internationaler
Anmeldetag:** 18. Dezember 1996

Anmelder/Inhaber: Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich/DE;
Marina Vrljic, Lothar Eggeling und
Hermann Sahm, Jülich/DE;

Bezeichnung: Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von
Aminosäuren durch gesteigerte Aktivität von
Exportcarriern

Priorität: 22.12.1995 DE 195 48 222.0

IPC: C 12 N 15/67

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser internationalen Patentanmeldung.

München, den 14. Dezember 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

PCT/DE 96 / 02485

Internationales Aktenzeichen

18. Dez. 1996 (18.12.96)

Internationales Anmeldedatum

RO/DE

Deutsches Patentamt
(German Patent Office)
PCT International Application

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) **PT 1.1331 PCT**

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren durch gesteigerte Aktivität von Exportcarriern

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH
Wilhelm-Johnen-Straße
D-52425 Jülich
Deutschland

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.: 02461/61-3004

Telefaxnr.: 02461/61-2860

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

VRLIJC, Marina
Steinstrasser Allee 60
D-52428 Jülich
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☐ Anwalt ☒ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH
Rechts- und Patentabteilung
D-52425 Jülich
Deutschland

Telefonnr.: 02461/61-3004

Telefaxnr.: 02461/61-2860

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

R. 11/11

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)*

EGGELING, Lothar
Elsenkamp 6
D-52428 Jülich

Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder *(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)*

SAHM, Hermann
Wendelinusstraße 71
D-52428 Jülich

Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder *(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)*

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder *(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)*

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder *(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |
| <input type="checkbox"/> LT Litauen | |
| <input type="checkbox"/> LU Luxemburg | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCHWeitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	22. Dezember 1995 (22.12.1995)	195 48 222.0	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☒ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.**Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE****Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA)** (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA /

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr):

Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

1. Antrag : 4 Blätter
 2. Beschreibung : 21 Blätter
 3. Ansprüche : 7 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 4 Blätter
 Insgesamt : 37 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift
 4. ☐ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):
 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 7. ☐ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 8. ☒ Sonstige (einzeln auflisten):
 Scheck Nr. 695704
 Scheck Nr. 695705

Abbildung Nr. 1 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

i.v. Ute Katscher
Dr. Ute Katscher
Ang-AV Nr. 815/96Marina Vrlije M. Vrlije(Dr.) Lothar Eggeling Lothar Eggeling(Prof.) Hermann Sahm H. Sahm

Jülich, den 16. Dez. 1996

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	18. Dez. 1996 (18.12.96)	2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA / <u>EP</u>	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:



Forschungszentrum Jülich GmbH

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrier-Aktivität und/oder die Exportgen-Expression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die endogene Exportcarrier-Aktivität des Mikroorganismus erhöht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß durch Mutation des endogenen Exportgens ein Carrier mit höherer Export-Aktivität erzeugt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Genexpression des Exportcarriers durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Exportgen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl eingebaut wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz aufweist.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt
wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden
Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt
wird, der einen erhöhten Anteil an
Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Exportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm der
Gattung Corynebacterium isoliert wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Exportgensequenz durch Vergleich mit der Sequenz
eines bereits bekannten Exportgens identifiziert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die von der zu identifizierenden Exportgensequenz
abgeleitete Aminosäuresequenz mit der in Tabelle 3
angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen
verglichen wird.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Exportgen-Expression durch Verstärkung der
Transkriptionssignale erhöht wird.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß als Exportgen ein Gen mit einer für die in Tabelle 3
angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen
kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß als Exportgen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder einer im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur
Herstellung von L-Lysin.
21. Für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierendes Exportgen.
22. Exportgen nach Anspruch 21 mit einer für die in Tabelle 3
angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen
kodierenden Nukleotidsequenz.
23. Exportgen nach Anspruch 22 mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder einer im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
24. Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 mit diesem
zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
25. Exportgen nach Anspruch 24,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1
angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen
kodierende Nukleotidsequenz aufweist.

26. Exportgen nach Anspruch 25,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von
Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweist.
27. Zur Regulation eines für einen Aminosäure-Exportcarrier
kodierenden Exportgens geeignetes Regulatorgen mit einer für
die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren
Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
28. Regulatorgen nach Anspruch 27 mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder einer im
wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
29. Genstruktur, enthaltend ein Exportgen nach einem der
Ansprüche 21 bis 26.
30. Genstruktur, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach
Anspruch 27 oder 28.
31. Vektor, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21
bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.
32. Vektor nach Anspruch 31 mit niedriger Kopienzahl.
33. Vektor, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach
Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.
34. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein
Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine
Genstruktur nach Anspruch 29.
35. Transformierte Zelle nach Anspruch 34, enthaltend einen
Vektor nach Anspruch 31 oder 32.

36. Transformierte Zelle nach Anspruch 34 oder 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie der Gattung Corynebacterium angehört.
37. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß in dieser die an der Synthese beteiligten Enzyme der
Aminosäure, die mittels des Exportcarriers, für das das in
die transformierte Zelle übertragene Exportgen kodiert, aus
der Zelle ausgeschleust wird, dereguliert sind.
38. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen erhöhten Anteil an
Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
39. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form eine
regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine
Genstruktur nach Anspruch 30.
40. Transformierte Zelle nach Anspruch 39, enthaltend einen
Vektor nach Anspruch 33.
41. Für den Export von Aminosäuren geeignete Membranproteine mit
6 transmembranen Helices.
42. Membranprotein nach Anspruch 41 mit der in Tabelle 3
angegebenen Aminosäuresequenz, wobei Tabelle 3 Bestandteil
dieses Anspruches ist.
43. Verwendung eines Exportgens zur Steigerung der
Aminosäureproduktion von Mikroorganismen.

44. Verwendung nach Anspruch 43,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein mutiertes Exportgen, das für ein Enzym mit erhöhter Exportcarrier-Aktivität kodiert, verwendet wird.
45. Verwendung nach Anspruch 43 oder 44,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Aminosäure-produzierende Mikroorganismus mit einem Genkonstrukt, das ein Exportgen enthält, transformiert wird.
46. Verwendung nach Anspruch 45,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen trägt.
47. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 46,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Exportgen aus Corynebacterium verwendet wird.
48. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 47,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus Corynebacterium verwendet wird.

Forschungszentrum Jülich GmbH

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren durch gesteigerte Aktivität von Exportcarriern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren gemäß den Ansprüchen 1 bis 20, Exportgene nach Anspruch 21 bis 26, Regulatorgene nach Anspruch 27 und 28, Genstrukturen gemäß den Ansprüchen 29 und 30, Vektoren nach Anspruch 31 bis 33, transformierte Zellen nach Anspruch 34 bis 40, Membranproteine gemäß Anspruch 41 und 42 sowie Verwendungen nach Anspruch 43 bis 48.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin, wie auch L-Threonin, und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament, oder L-Glutamat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B.

Corynebacterium glutamicum und seine Verwandten ssp. *flavum* und ssp. *lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol (1991) 41:255-260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschaltung der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist ein Verfahren beschrieben, bei dem *Corynebacterium*-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Threoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849 B1, UK Patent Application GB 2 152 509 A).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmidkodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 124375/1986, EP 0 488 424). Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese codieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die

Lysinbildung durch erhöhte Synthese der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Threoninbildung erreicht (EP 0 436 886 A1).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin, oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463 A2). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 3331 145).

Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Als eine weitere Limitation kommt grundsätzlich aber auch der Export der im Zellinneren gebildeten Aminosäuren ins Kulturmedium in Betracht. Daher gibt es vereinzelte Ansätze, diesen Export und damit die Wirtschaftlichkeit der Aminosäureproduktion zu verbessern. So hat man die Zellpermeabilität bei *Corynebacterium* durch Biotinmangel, Detergenz- oder Penicillinbehandlung erhöht. Diese Ausschleusehilfen waren jedoch ausschließlich bei der Glutamatproduktion erfolgreich, während die Synthese anderer Aminosäuren auf diese Weise nicht verbessert werden konnte. Auch sind Bakterienstämme entwickelt worden, bei denen die Aktivität des Sekretionssystems aufgrund chemischer oder physikalischer Mutation erhöht ist. Es wurde dadurch beispielsweise ein *Corynebacterium glutamicum*-Stamm erhalten, der sich durch eine verbesserte Sekretionsaktivität insbesondere für die L-Lysinproduktion eignet (DE 42 03 320).

Insgesamt zeichnen sich alle bisher durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren dadurch aus, daß ein erhöhter Efflux von Aminosäuren aufgrund der gewählten ungerichteten bzw. unspezifischen Methoden nur durch Zufall erreicht werden konnte. Einzig in der Deutschen Patentanmeldung No. 195 23 279.8-41 ist ein Verfahren beschrieben, das es erlaubt, die Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren ganz gezielt zu erhöhen, indem die Expression von für den Import von Aminosäuren kodierenden Genen erhöht wurde. Die dieser Vorgehensweise zugrundeliegende Erkenntnis, daß die Zelle Importproteine für den Export von Aminosäuren verwendet wie auch die Tatsache, daß Mikroorganismen von Natur aus keine überschüssigen Aminosäuren bilden und ausscheiden, legt die Vermutung nahe, daß für den Aminosäuretransport spezifische Exportgene bzw. -proteine gar nicht existieren, sondern daß aus der Zelle die Aminosäuren über andere Exportsysteme exkretiert werden.

Die bisher bekannten Exportsysteme exportieren giftige Metallionen, toxische Antibiotika und höhermolekulare Toxine. Diese Exportsysteme sind relativ komplex aufgebaut: In der Regel sind Membranproteine der Cytoplasmamembran beteiligt, die jedoch nur eine Teilreaktion des Exports bewirken, so daß vermutlich für den Transport zusätzliche, extracytoplasmatische Hilfsproteine erforderlich sind (Dinh, T. et al., A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1994, 176: 3825-3831). Desweiteren ist bekannt, daß bei dem sec-abhängigen Exportsystem für extrazelluläre Proteine mindestens 6 verschiedene Proteinkomponenten für den Export essentiell sind. Dieser Stand der Technik legt die Vermutung nahe, daß ebenso die für den Export von Aminosäuren zuständigen, aber bislang unbekannten Systeme aus mehreren Proteinkomponenten bestehen bzw. mehrere Gene für den Export von Aminosäuren zuständig sind. Hinweis dafür könnten die von Vrljic

et al. beschriebenen (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) verschiedenen, im Lysinexport defekten Mutanten sein.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgen-Expression und/oder die Exportcarrier-Aktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Export der entsprechenden Aminosäure erhöht ist. Auch akkumulieren derart veränderte Mikroorganismen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure im Kulturmedium.

Zur Erhöhung der Exportcarrier-Aktivität wird insbesondere die endogene Aktivität eines Aminosäure-produzierenden Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikationen oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene Exportcarrier-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen Exportgens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

Die Exportgen-Expression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Exportgen-Expression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Exportgen zugeordneten Regulatorgens erfolgen, wie weiter unten ausgeführt wird. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Exportgen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, vorzugsweise in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Die regulatorischen Gensequenzen weisen insbesondere eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz bzw. eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz auf. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei aber die Regulatorprotein-Aktivität bzw. -Funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist: So kann durch Mutation der regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung des Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Exportgens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression

erhöht ist. Desweiteren können dem Exportgen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Exportgen-Expression bewirken.

Für den Einbau des Exportgens in ein Genkonstrukt wird das Exportgen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert, und mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium*, transformiert. Die Isolierung und Transformation des entsprechenden Transportgens erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle der Isolierung und Klonierung eines Transportgens aus *Corynebacterium* eignet sich beispielsweise die Methode der homologen Komplementation einer exportdefekten Mutante (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Falls keine direkte Klonierung des Strukturgens möglich ist, kann zunächst auch die Insertion von Vektorsequenzen in das Transportgen erfolgen, um es dann über "plasmid-rescue" in Form inaktiver Fragmente zu isolieren. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* ATCC 13032 oder *C. glutamicum ssp. flavum* ATCC 14067 oder auch *C. glutamicum ssp. lactofermentum* ATCC 13869. Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688; Gene 102 (1991) 93-98), erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al. (1989) FEMS Microbiol Lett 65: 299-304) oder Konjugation (Schäfer et al. (1990) J Bacteriol 172: 1663-1666). Für die Übertragung werden vorzugsweise Vektoren mit niedriger Kopienzahl eingesetzt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäuren dereguliert sind und/oder die einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten.

Nach Isolierung sind Exportgene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweisen. Auch hier umfassen Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen insbesondere funktionelle Derivate im oben für die regulatorischen Sequenzen angegebenen Sinne. Diese Exportgene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Dem Exportgen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Durch Klonierung von Exportgenen sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Exportgen enthalten und - wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines Aminosäure-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Es sind eine Vielzahl von Sequenzen bekannt, die für Membranproteine unbekannter Funktion kodieren. Durch die erfindungsgemäße Bereitstellung von Exportgenen, wie beispielsweise des Exportgens mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2, bzw. der entsprechenden Exportproteine, wie z.B. das mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 1, können nunmehr Membranproteine, deren Funktion der Transport von Aminosäuren ist, durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Das damit identifizierte Exportgen kann anschließend zur

Verbesserung der Aminosäureproduktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Membranproteine besitzen in der Regel 12, zum Teil auch 4 transmembrane Helices. Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß die für den Export von Aminosäuren zuständigen bzw. geeigneten Membranproteine 6 transmembrane Helices aufweisen (vgl. z.B. die in Tabelle 3 aufgeführte Aminosäuresequenz eines Exportproteins, bei der die 6 transmembranen Bereiche durch Unterstreichen kenntlich gemacht sind). Damit liegt hier eine bisher noch nicht beschriebene und somit neue Klasse von Membranproteinen vor.

Ausführungsbeispiele

a) Klonierung eines Exportgens und Klonierung eines Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) wurde, wie bei Scharzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* gespalten und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) beschrieben, aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch auf ihre Größe hin analysiert und die Fraktion mit einer Fragmentgröße von etwa 6-10 kb zur Ligation mit dem Vektor pJC1 eingesetzt. Dazu wurde der Vektor pJC1 mit *Bam*HI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurde mit 20 ng der chromosomalen 6-10 kb Fragmente ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde die exportdefekte Mutante NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) durch Elektroporation (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) transformiert. Die Transformanten wurden auf LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) mit 15 µg Kanamycin pro ml selektioniert. Diese Transformanten wurden umfangreichen Plasmidanalysen unterzogen, indem 200 der insgesamt 4500 erhaltenen Klone einzeln angezogen, und deren Plasmidanteil, und -größe bestimmt wurden. Im Durchschnitt trug etwa die Hälfte der untersuchten Kanamycin-resistenten Klone ein rekombinantes Plasmid mit einem Insert der durchschnittlichen Größe von 8 kb. Damit ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 0,96 für die Anwesenheit jedes x-beliebigen Gens aus *C. glutamicum* in der errichteten Genbank. Die 4500 erhaltenen Transformanten wurden alle einzeln auf Wiedererhalt der Lysinsekretion geprüft. Dazu wurde das von Vrljić beschriebene System zur Induktion der L-

Lysinausscheidung in *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Dazu wurden sogenannte Minimalmedium-Indikatorplatten hergestellt, die pro Liter 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g Harnstoff, 1 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 42 g Morpholinopropansulfon-säure, 1 ml CaCl_2 (1 g/100 ml), 750 ml dest., 1ml Cg Spuren-salze, 1 ml Biotin (20 mg/100 ml), pH7, 4 % Glukose 1,8 mg Protokatechusäure, 1 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,02 mg CuSO_4 , 0,002 mg $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 20 g Agar-Agar, sowie 10^7 Zellen/ml der Lysin-auxotrophen *C. glutamicum* Mutante 49/3 enthielten. Die ursprünglichen 4500 Transformanten wurden alle einzeln mittels Zahnstocher auf die Indikatorplatten gepickt, mit jeweils einer Kontrolle des ursprünglichen Nichtausscheiders NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) und des Ausgangsstammes R127. Parallel wurden jeweils 2 Platten beimpft, von denen nur eine zusätzlich 5 mM L-Methionin enthielt, um so die Lysinausscheidung zu induzieren. Die Indikatorplatten wurden bei 30 °C inkubiert, und nach 15, 24 und 48 Stunden untersucht. Insgesamt wurden so 29 Klone erhalten, die auf der mit Methionin versetzten Indikatorplatte einen Wachstumshof durch den Indikationsstamm 49/3 zeigten. Die Klone wurden vereinzelt, und dann erneut, wie oben beschrieben, auf Wiedererhalt des Wachstumshofs geprüft. Auf diese Weise wurden die zwei Klone NA8 pMV8-5-24 und NA8 pMV6-3 erhalten, die die Fähigkeit wiedererhalten hatten, Lysin auszuscheiden.

Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, durchgeführt. Durch Retransformation in NA8 wurde der plasmidgebundene Effekt der Ausscheidung von L-Lysin bestätigt. Beide Plasmide wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Plasmid pMV8-5-24 trägt ein Insert von 8,3 kb, und pMV6-3 eines von 9,5 kb. Die physikalische Kartierung der Inserts zeigt Figur 1.

b) Subklonierung eines DNA-Fragments, das den Lysinexport rekonstituiert

Vom Insert des Plasmids pMV6-3 wurden unter Nutzung der bestimmten Restriktionsschnittstellen einzelne Subklone hergestellt. So wurde das 3,7 kb *XhoI-SalI*-Fragment, das 2,3 kb *BamHI*-Fragment und das 7,2 kb *BamHI*-Fragment mit dem entsprechend geschnittenem und behandeltem Vektor pJCI (Mol Gen Genet (1990) 220: 478-480) ligiert. Mit den Ligationsprodukten wurde direkt *C. glutamicum* NA8 transformiert, die Transformanten wie oben beschrieben auf Wiedererhalt der Lysinausscheidung geprüft und die Anwesenheit des Subklons durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse bestätigt. Auf diese Weise wurde als kleinster Subklon der Stamm mit Plasmid pMV2-3 erhalten (Figur 1). Dieses, den Lysinexport vermittelnde Fragment enthält als Insert das 2,3 kb *BamHI*-Fragment aus pMV6-3.

c) Sequenz des Lysinexportgens *lysE* und dessen Regulators *lysG*

Die Nukleotidsequenz des 2,3 kb *BamHI*-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. durchgeführt (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463-5467), und die Sequenzierungsreaktionen mit dem AutoRead Sequencing kit von Pharmacia (Uppsala, Sweden). Die elektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz-DNA Sequenziergerät (A.L.F.) von Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, USA). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Nukleotidsequenz und das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Analyse ergibt zwei vollständige offene Leseraster (ORF) auf dem sequenzierten DNA-Stück. ORF1 kodiert für ein Protein mit einer Länge von 236 Aminosäuren, ORF2 für eins mit einer Länge von 290 Aminosäuren. Das von ORF1 abgeleitete Protein zeigt eine Häufung hydrophober

Aminosäuren, wie sie für membranständige Proteine charakteristisch ist. Die detaillierte Analyse der Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren mit dem Programm PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521-533) ist in Tabelle 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß das Protein sechs hydrophobe Helixbereiche enthält, die die Membran durchqueren. Damit handelt es sich bei diesem Protein um den gesuchten Exporter der Aminosäure L-Lysin. Das entsprechende Gen wird deswegen im Folgenden als *lysE* bezeichnet. Es ist entsprechend in Tabelle 2 markiert. ORF2 wird in Gegenrichtung zu ORF1 transkribiert. Die Sequenzanalyse zeigt, daß ORF2 hohe Identität mit Regulatorgenen hat, die als eine Familie zusammengefaßt werden (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Gene dieser Familie regulieren die Expression der verschiedensten an katabolen oder anabolen Prozessen beteiligter Gene in positiver Weise. Im Folgenden wird ORF2 deswegen als *lysG* (Govern = Regulieren) bezeichnet. Wegen dieser Zuordnung, und weil *lysE* nur zusammen mit *lysG* kloniert (siehe a)) und subkloniert werden konnte (siehe b)), ist *lysG* Regulator von *lysE* und somit ebenfalls am Lysinexport beteiligt. Das Gen *lysG* und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz sind ebenfalls in Tabelle 2 bzw. Tabelle 1 gezeigt.

d) Identifizierung eines unbekannten Membranproteins aus *Escherichia coli* durch Sequenzvergleich

Mit den etablierten Sequenzen gemäß Tabelle 3 können bereits existierende Sequenzbanken durchsucht werden, um so den von sequenzierten Bereichen abgeleiteten Proteinen eine Funktion zuzuordnen. Entsprechend wurde die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *C. glutamicum* unter Zuhilfenahme des Programmpakets HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) mit abgeleiteten Protein-Sequenzen aller dort deponierten DNA-Sequenzen verglichen. Zu einer einzigen Sequenz bisher unbekannter Funktion aus *E. coli* ergab sich eine hohe Homologie von 39,3 % identischen

Aminosäuren, und 64,9 % ähnlichen Aminosäuren. Der Vergleich ist in Figur 2 gezeigt. Das bislang nicht charakterisierte offene Leseraster aus *E. coli* ist über dieses Verfahren damit als ein Aminosäureexportgen identifiziert.

e) Gesteigerter Export intrazellulär akkumulierten L-Lysins

Der Stamm *C. glutamicum* NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) wurde mit Plasmid pMV2-3 transformiert, und die L-Lysinausscheidung der Stämme verglichen. Dazu wurden NA8 und NA8pMV2-3 in Komplexmedium wie bei Vrljic et al. (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) beschrieben angezogen, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) jeweils getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 5 mM L-Methionin, um die intrazelluläre L-Lysinbiosynthese zu induzieren. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 30 °C auf dem Rotationsschüttler bei 140 Upm wurde zellinterne und externe L-Lysinbestimmungen durchgeführt. Zur zellinternen Bestimmung wurden Silikonölzentrifugationen durchgeführt (Methods Enzymology LV (1979) 547-567); die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatografie (J Chromat (1983) 266: 471-482). Diese Bestimmungen wurden zu verschiedenen Zeiten, wie in Figur 3 angegeben, durchgeführt. Entsprechend dem benutzten Verfahren wird das angestaute zellinterne L-Lysin also durch pMV2-3 vermehrt ausgeschieden und akkumuliert. Entsprechend ist erwartungsgemäß auch das zellintern vorhandene L-Lysins stark reduziert. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Exporters ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

f) Gesteigerte Akkumulation von L-Lysin durch *lyse* oder *lyseG*

Vom Subclon pMV2-3, der das sequenzierte 2374 bp *Bam*HI-Fragment in pJC1 enthält (siehe Figur 1), wurde entsprechend der Sequenzinformation das *lyse* tragende 1173 bp *Pvu*II-*Hind*II

Fragment in pZ1 (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688) ligiert, und so das Plasmid *plySE* erhalten. Dieses Plasmid, sowie das *lysElysG* tragende Plasmid pMV2-3 wurde durch Elektroporation in *C. glutamicum* Stamm d eingeführt, indem chromosomale Bereiche deletiert sind. Die erhaltenen Stämme *C. glutamicum* d pMV2-3, *C. glutamicum* d *plySE*, *C. glutamicum* pJC1 wurden wie unter e) beschrieben zunächst auf Komplexmedium vorgezogen, dann in Produktionsminimalmedium CGXII zusammen mit 4% Glukose und 5 mM L-Methionin kultiviert, und Proben zur Bestimmung des akkumulierten L-Lysins entnommen. Wie aus Figur 4 ersichtlich, wird durch *lysElysG* eine Steigerung der Lysinakkumulation gegenüber der Kontrolle erreicht. Die *plySE* wird durch dieses Verfahren eine außerordentlich gesteigerte Akkumulation von 4,8 auf 13,2 mM L-lysin erreicht.

Legenden der Tabellen und Figuren:

Tabelle 1: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporter-Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*, mit dem für DNA-bindende Proteine typischen Helix-Turn-Helix Motif.

Tabelle 2 (drei Seiten): Die Nukleotidsequenz des für den Lysinexporter und Lysinexport-Regulators codierenden Bereichs aus *C. glutamicum*.

Tabelle 3: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *Corynebacterium glutamicum*, mit den identifizierten transmembranen Helices TMH1 bis TMH6.

Figur 1: Die durch die Klonierung erhaltenen DNA-Fragmente in pMV6-3 und pMV8-5-24, die die Lysinsekretion bewirken, sowie der aus pMV6-3 hergestellte Subklon pMV2-3, der ebenfalls die Lysinsekretion bewirkt und sequenziert wurde. B, *Bam*HI; Sm, *Sma*I; Sc, *Sac*I; Sl, *Sal*I; H, *Hind*II; X, *Xho*I.

Figur 2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Lyse aus *C. glutamicum* (oben), mit einem Genprodukt bislang unbekannter Funktion aus *Escherichia coli* (unten), das dadurch als Exportcarrier identifiziert ist.

Figur 3: Gesteigerter Lysinexport durch pMV2-3 mit *C. glutamicum* NA8. Oben, die Kontrolle mit geringer Ausscheidung und zellinternem Anstau von Lysin bis etwa 150 mM. Unten die durch pMV2-3 bewirkte hohe Ausscheidung mit zellinternem nur geringem Anstau von etwa 30 mM.

Figur 4: Die Steigerung der Lysinakkumulation in *C. glutamicum* durch *lysElysG* (pMV2-3) (mittlere Kurve), und die durch *lysE* (*plysE*) bedingte Akkumulation (obere Kurve).

Tabelle 1

1 MNPIQLDTLL SIIDEGSFEG ASLALSISPS AVSQRVKALE HHVGRVLVSR
Helix-Turn-Helix-Motiv
51 TQPAKATEAG EVLVQAARKM VLLQAETKAQ LSGRLAEIPL TIAINADSLS
101 TWFPVPFENEV ASWGGATLTL RLEDEAHTLS LLRRGDLVGA VTREANPVAG
151 CEVVELGTMR HLAIAATPSLR DAYMVDGKLD WAAMPVLRFG PKDVLQDRDL
201 DGRVDGPVGR RRVSIVPSEAE GFGEAIRRGL GWGLLPETQA APMLKAGEVI
251 LLDEIPIDTP MYWQWRRLS RSLARLTDAV VDAAIEGLRP

GGTAAACGACTTCCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCCCGTTCTTCACTTTTGT. 60

/ LysG 120
GGAATTGGAAAAGTCTTCATTGATTCCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG
- P R L G E I A A D V V A

CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA 180
D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T

CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGACGAAAATCGTACCCTCGTCAAC 240
D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q

CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTGGGAAGGCG 300
T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A

GCTGCCCTGTTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGTCCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG 360
S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D

TGCCAGAACTTCGTGTAGAAACCCTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTCCGGTTAGATC 420
R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L

AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA 480
K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M

CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG 540
T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G

ATTTTGTAGAGGTGCGGCGTCGTTCTTATTACACACGCGAAGTAGAAGGTTGCGGTGCGA 600
L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T

CTCGCAACGAGGTGGGGTCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTTGGTACACCTATC 660
L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L

GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCAACGCG 720
S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A

AAATCAAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAGGCGCGACGAACGTGTTCTGAAGTGGGCG 780
K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A

AAGCCAACGAAACCGGCCAACCCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC 840
E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L

TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTTACCTTTCCCGATTCTCCGCGGAAG 900
A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E

Tabelle 2

CTTCGACGGAAGTAGTTACTAACTCTCGTTTCACAGGTCAACTTACCCCAAGTA-----5' 960
5'---TGCCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCAGTTGAATGGGGTTTCATGAAGCT
F S G E D I I S L L T D L Q I P N M
ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTTACTTAAGTACTTCCATAGGTCACGATGGT 1020
M V
/LysE->
GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCTGCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG 1080
I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G
ACCGCAGAATGTACTGGTGATTAAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTGCGGTTCT 1140
P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L
TCTCGTGTGTTTAATTTCTGACGTCTTTTGTTCATCGCCGGCACCTTGGGCGTTGATCT 1200
L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L
TTGTCCAATGCCGCGCCGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT 1260
L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L
GTTATGGTTTGCCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAGGTGGAAGCGCCACA 1320
L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q
GATCATTGAAGAAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCTTTGGGCGGTTTCGGCGGT 1380
I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V
GGCCACTGACACGCGCAACCGGGTGCGGGTGGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG 1440
A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W
GGTAAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCCGAATGCGTATTTGGA 1500
V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D
CGCGTTTGTGTTTATCGGCGGCGTGGGCGGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATTTT 1560
A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F
CGCCGCTGGCGCGTTTCGCGGCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCGGCGCAGC 1620
A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A
AGCATTGTCACGCCCCGCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC 1680
A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A

Tabelle 2 (fortgesetzt)

1740

/ orf3
- N E R T K

5' CTACTGGCGTAACCGGTAGTTTGA CTACA ACTACCCAATCAAAGCGCCCAAAA
AGTTGTGATGACCGCATTGGCCATCAA ACTGATGTTGATGGGTTAGTTTTCGCGG 5'
V V M T A L A I K L M L M G -
LysE /

1800

CCTTAGCCACCGGAAGCGGGTTTACA ACTACGGCCGAGCACCCCTTTAGAGTAGCTAGCG
S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A

1860

GAGGTTGAGCCGAGTCTTTGAGGTTCAACA ACTCACTTAGTTCCGACAACAGGTCGAC
E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q

1920

GAGTTGACTGCTTCGTGGTTAGTTACGTGAC CAGTGCCATAGGCGCGGCATGAGAGGAAC
E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q

1980

GAGCGCGTCGTGGGTACGTTTCGCGGTAGACGCGTTC ACTGACGGGCGCAAGGACCCGCTA
E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I

2040

CAGTA ACTCGAACGCCTGGTATAGTTATAACA AGTGCAAGTTGTACGGGAGTCTGTCCCT
D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S

2100

GAATGGGACCGACCGCGCCCTTGGGAGACCTTAAGGTAGCTCTATAAACAGGCACTCGTC
K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L

2160

CGGGACGCGTTCACCACTCTTTTCGTTACTGCGGTTCTGGTAACAACCGTCGACTGACGTT
G Q A L P S F A I V G L G N N A A S Q L

2220

GTTCAAGAGTGGCAGTAGCGGGCCAAGGAGGTGGGTTGCTAATTACTACCTTATCGAACC
L N E G D D G P E E V W R N I I S Y S P

2280

GACTACTTAGTCTTCGCCCCTCGGGAGGAGCGGTACTTGAGTCGGCGGAGGCGACACTC
Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

2340

GAGACCTGGCATCCTTCTTTATGGGTGCATTTCTCGGAAAGGTCTGCGTTGTTACAGTGC
E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

2374

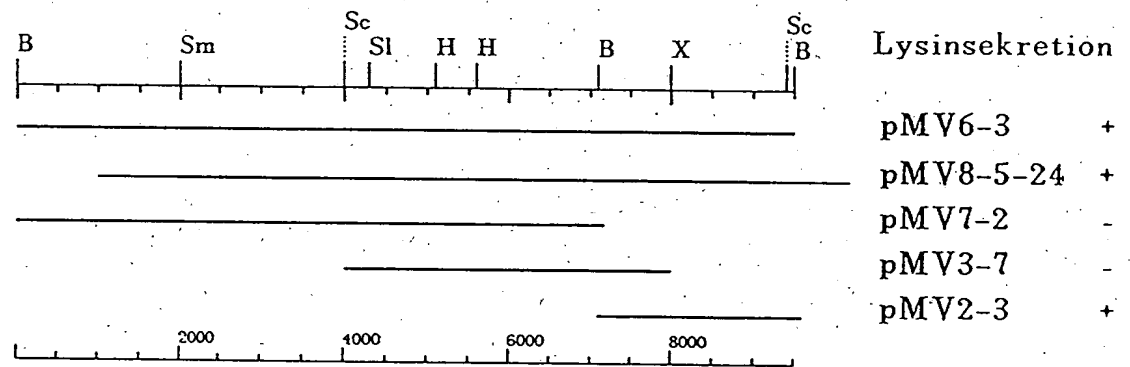
<-orf3/

GTTACGCATGTACCAAAGAAGGTTTCCTCATAGA
L A Y M T E E L P T D

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Tabelle 3

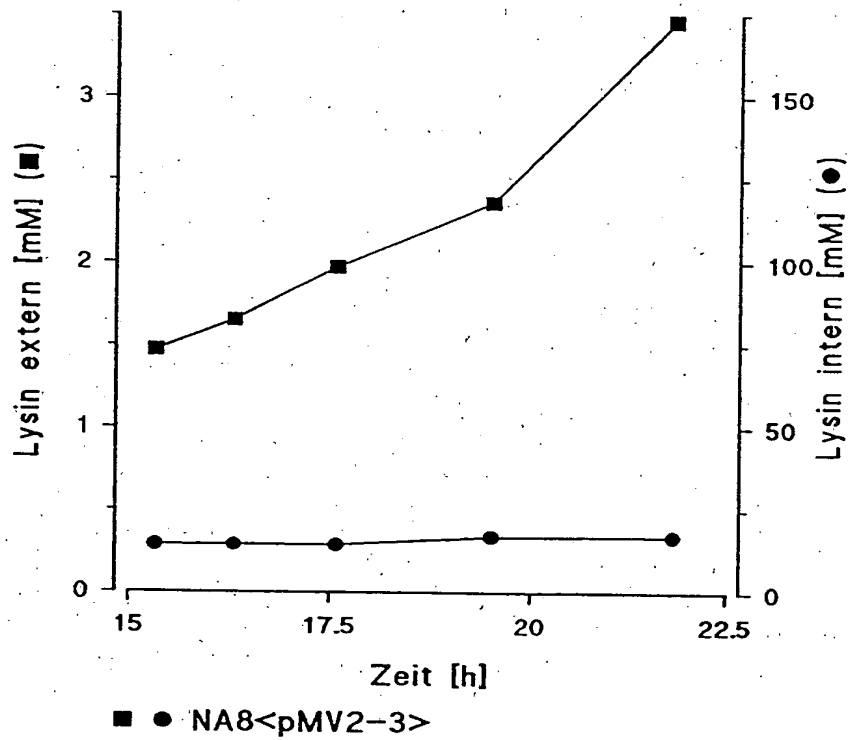
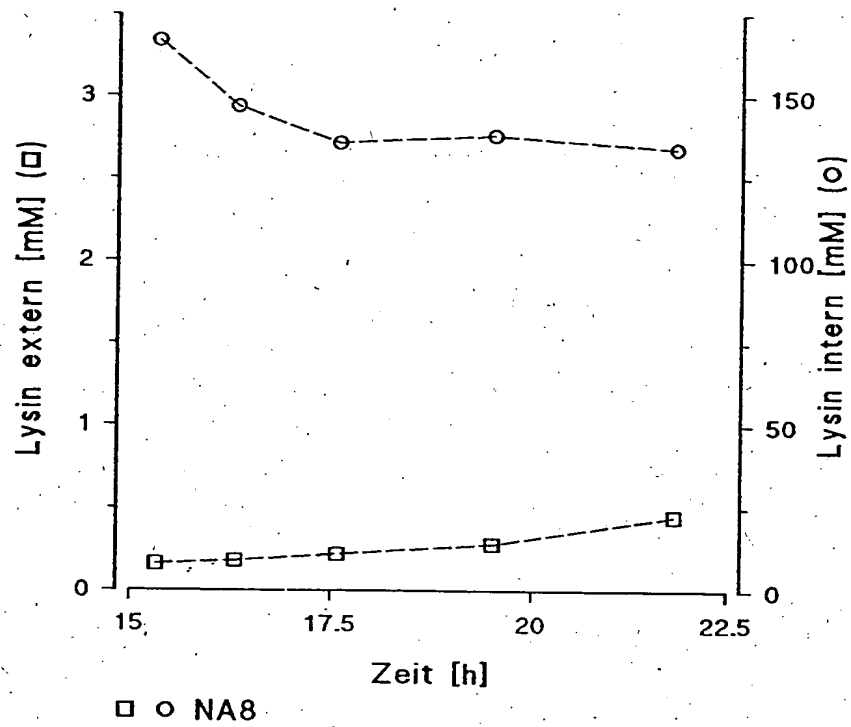
1	<u>MVMEIFITG LLLGASLLS IGPQNVLVIK QGIKREGLIA VLLVCLISDV</u>	TMH1	TMH2
51	<u>ELFIAGTLGV DLLSNAAPIV LDIMRWGGIA YLLWFVAVMAA KDAMTNKVEA</u>		
		TMH3	
101	<u>PQIIETEPT VPDDTPLGGS AVATDTRNRV RVEVSVDKQR VWVKPMLMAI</u>		
151	<u>VLTWLNPNAY LDAFVFIGGV GAQYGDGTGRW IFAAGAFAS LIWFPLVGFG</u>	TMH4	TMH5
201	<u>AAALSRLSS PKVWRWINVV VAVVMTALAI KLMLMG</u>		
		TMH6	



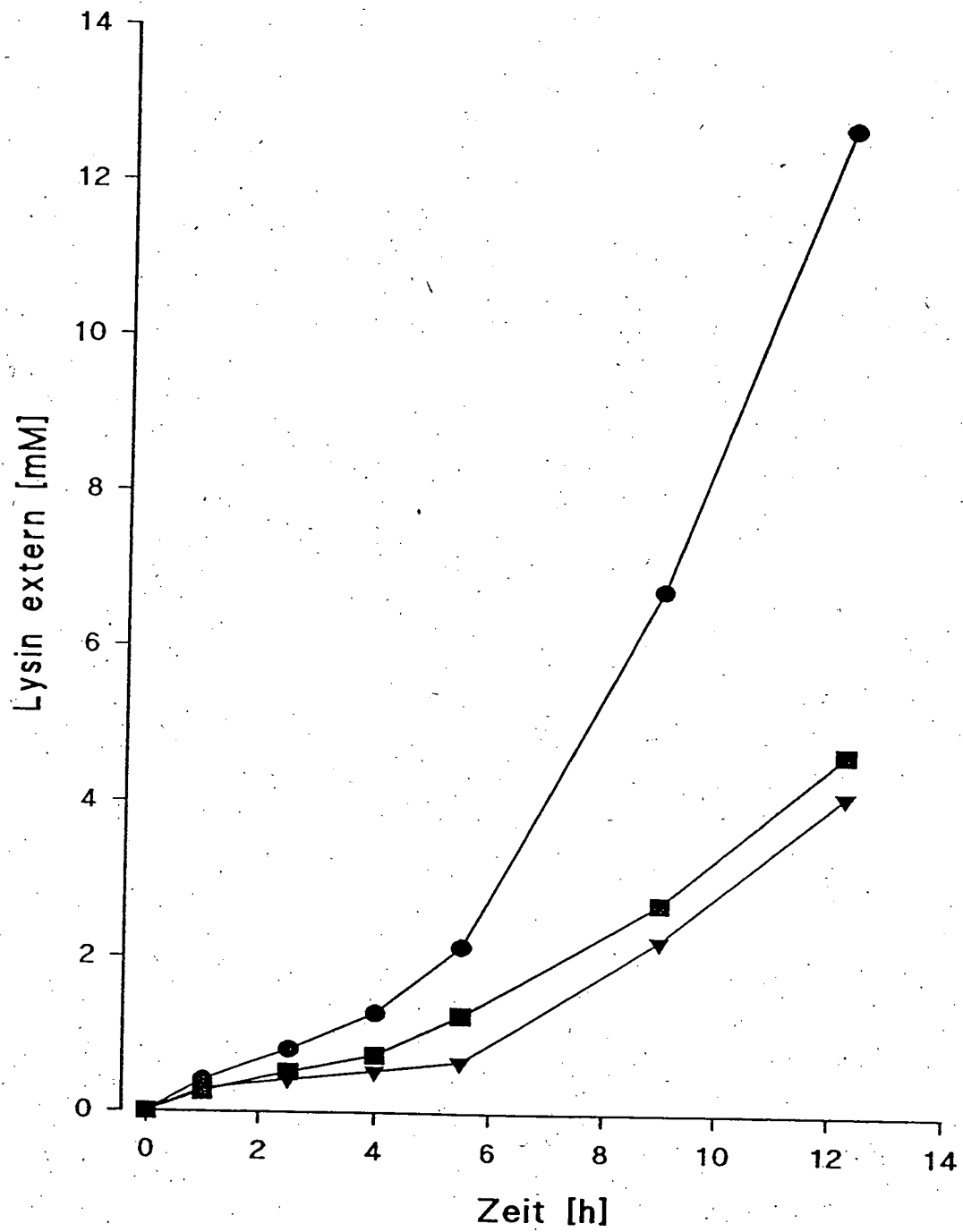
Figur 1

Figur 2

Komplementation des Exportdefektes



Figur 3



Figur 4